

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局(43) 国际公布日:  
2003年10月23日(23.10.2003)

PCT

(10) 国际公布号:  
WO 03/086425 A1

(51) 国际分类号: A61K 35/78, A61P 29/00

(21) 国际申请号: PCT/CN02/00246

(22) 国际申请日: 2002年4月9日(09.04.2002)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 四川省中药研究所(SICHUAN INSTITUTE OF CHINESE MATERIA MEDICA) [CN/CN]; 中国四川省成都市人民南路四段51号, Sichuan 610041 (CN)。广州陈李济药厂(GUANGZHOU CHEN LI JI PHARMACEUTICAL FACTORY) [CN/CN]; 中国广东省广州市广州大道南1688号, Guangdong 510290 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人(仅对美国): 邓文龙(DENG, Wenlong) [CN/CN]; 中国四川省成都市人民南路四段51号, Sichuan 610041 (CN)。

(74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所(CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街2号8层, Beijing 100037 (CN)。

(81) 指定国(国家): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) 指定国(地区): ARIPO专利(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI专利(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人在国际申请日有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))对除美国以外的所有指定国
- 发明人资格(细则4.17(iv))仅对美国

本国际公布:

- 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: AN ANTI-RHEUMATISM MEDICAMENT AND METHOD TO PREPARE THEREOF

(54) 发明名称: 一种抗风湿药物及其制备方法

(57) Abstract: This invention discloses an anti-rheumatism medicament. This invention also provides a method of its preparation. The medicament can be made from these herbal materials including Tripterygium hypoglaucum (Levl.) Hutch, Epimedium brevicornum Maxim, Lycium barbarum L. and Cuscuta chinensis Lam., or C. Australis R. Br. It has advantages such as notable therapeutic effect, low side effect and easy intake.

(57) 摘要

本发明公开了一种抗风湿药物及其制备方法, 该药物以昆明山海棠、淫羊藿、枸杞子、菟丝子为原料制成, 本发明药物具有疗效突出、毒副作用轻和服用方便的特点。

## 一种抗风湿药物及其制备方法

### 技术领域

本发明涉及一种药物及其制备方法，特别是涉及一种抗风湿的中药及其制备方法。

### 背景技术

普遍认为，风湿病和类风湿性关节炎(RA)是一种难以治愈的疾病，约有 18,000,000 RA 患者因病致残。对于治疗 RA 新药的研究已经持续进行了近百年，阿斯匹林是最早广泛使用于 RA 的药物。治疗 RA 的药物可概分为两类：非类固醇类抗炎药物(NSAIDs)和免疫抑制剂。NSAIDs 包括环氟拉嗪或者消炎痛，以及肾上腺皮质激素。临床研究表明，NSAIDs 是有效的；免疫抑制剂和细胞毒类药物包括氨甲喋呤、环磷酰胺、青霉胺等等。近年来，免疫调节已被用作风湿性疾病的治疗方法。所有抗风湿药都表现出较为严重的副作用，而直到现在，还未研制出一种更加高效低毒的药物。

在抗风湿药物的研究和发展中有三方面是最需要强调的。第一方面包括 NSAIDs 和细胞因子拮抗剂，例如重组可溶性肿瘤坏死因子拮抗剂、白细胞介素-1 抑制剂和血小板活化因子抑制剂。第二方面是一种新的免疫抑制剂或者免疫调节剂，如环孢霉素 A。第三方面是复方药物。

在中医药学领域中研究对于痹病(RA)的治疗早至可以追溯到中国古代医药学家张仲景的“麻杏石甘汤”、“防己黄芪汤”和“乌头汤”。“火把花”是一种生长在四川省的野生植物，在局部地区的临床实验中(四川)被证实对风湿症患者有一定疗效。不幸的是，同时也观察到许多不可控制的问题和对人体生殖系统的严重副作用。

中医药治疗痹病有悠久历史，经历代医家发展，中医药对痹病的治疗已有较高的疗效和众多药物，中国药典一九九五版、二〇〇〇版收载

可治疗痹病的单味药不少于 80 味，成药 29 种。但也存在一些问题，主要是①对严重的痹病如类风湿性关节炎疗效尚欠理想，②制剂剂型不能满足现代生活需要，③少数药物疗效堪称佳良，但毒副作用大，如雷公藤制剂。因此研制高效低毒、剂型适合现代生活和用药习惯的抗风湿药物，特别是其疗效能与抗风湿合成药相近而毒副作用相对较低的药物是必要的。

### 技术内容

本发明目的在于提供一种具有抗风湿作用的、高效低毒、服用方便的复方药物；本发明目的还在于提供一种具有抗风湿作用的药物的制备方法

本发明药物技术方案是通过选取如下原料药实现的：

昆明山海棠 (*Tripterygium hypoglaucum* (Levl.) Hutch.)

淫羊藿 (*Epimedium brevicornum* Maxim.)

枸杞子 (*Lycium barbarum* L.)

菟丝子 (*Cuscuta chinensis* Lam., *Cuscuta australis* R. Br.)

本发明的药物由上述原料药制成。

其中原料药可以是由昆明山海棠与其余三种药物中的任何一种或两种或三种共同组成。

本发明药物最优选原料药配比为：

昆明山海棠 1~4 重量份      淫羊藿 1~4 重量份

枸杞子 1~4 重量份      菟丝子 1~4 重量份

本发明药物最优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 2 重量份      淫羊藿 2 重量份

枸杞子 1 重量份      菟丝子 1 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 1~4 重量份      淫羊藿 1~4 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 2 重量份      淫羊藿 2 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 1~4 重量份      淫羊藿 1~4 重量份

枸杞子 1~4 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 2 重量份      淫羊藿 2 重量份

枸杞子 1 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 1~4 重量份      淫羊藿 1~4 重量份

菟丝子 1~4 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 2 重量份      淫羊藿 2 重量份

菟丝子 1 重量份

以上药物组合物含量为淫羊藿甙  $C_{33}H_{40}O_{15}$  计不得少于 2.0mg。

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 1~4 重量份和枸杞子 1~4 重量份和/或菟丝子 1~4 重量份

本发明药物优选原料药配比还可以为：

昆明山海棠 2 重量份和枸杞子 1 重量份和/或菟丝子 1 重量份

将上述原料药按比例称取，用常规制剂工艺可制成任何临床可接受的药物剂型，如丸剂、散剂、膏剂、片剂、胶囊剂，如硬胶囊和软胶囊、颗粒剂、针剂等。

本发明药物制备方法为：

称取原料药：

昆明山海棠 1~4 重量份      淫羊藿 1~4 重量

枸杞子 1~4 重量份                  菟丝子 1~4 重量份

将昆明山海棠、淫羊藿切碎，分别加水煎煮 2~4 次，枸杞子、菟丝子分别用 80℃~95℃ 水温浸 1~3 次，分别每味中药的各次煎煮液或温浸液合并后，各合并液分别上各自对应的大孔吸附树脂柱；吸附完毕，用水冲洗树脂柱至流出液澄清，然后用 60%~80% 乙醇洗脱，至流出液颜色变深时开始收集洗脱液，直至洗脱液颜色由深变极浅时，用水压出柱上乙醇液，并与洗脱液合并，总洗脱液约为药材重量的 3~8 倍；每味中药的洗脱液分别回收、浓缩至比重 1.10，并分别喷雾干燥得各药材提取物；将四种提取物混匀，制成任何临床可接受的剂型。

本发明方法优选下述工艺步骤：

昆明山海棠 2 重量份          淫羊藿 2 重量份

枸杞子 1 重量份              菟丝子 1 重量份

昆明山海棠切成碎块，分别加 13、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；淫羊藿切段，分别加 15、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；枸杞子粉碎成粗料，用 20 倍水 80℃ 温浸 1 小时，连续 3 次；菟丝子粉碎成粗粉，用 31 倍水 80℃ 温浸 1 小时，连续 3 次；四味药材的水煎煮液或水浸出液分别滤过，分别通过大孔吸附树脂柱 JD-1(WLD)，然后用 70% 乙醇洗脱，当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液。当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕；每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥，最后分别得到提取物药粉；将四种提取物药粉混匀，制成任何临床可接受的剂型。

本发明药物的制备还可以采用下述方法：

称取原料药，淫羊藿、昆明山海棠分别切碎；枸杞子、菟丝子原形或粉碎，以上四味，分别或合并用 0~95% 的乙醇于 10~98℃ 提取，连续 1~4 次，提取液分别或合并回收乙醇后浓缩，干燥，粉碎，混匀或按比例混匀，制为临床可接受的剂型。

本发明药物还可以以上述原料药当中的有效成分制备而成。

上述原料药当中，淫羊藿含有淫羊藿甙，淫羊藿次甙 I，淫羊藿次甙 II 和淫羊藿糖甙 A，昆明山海棠当中含有双萜类，三萜类和生物碱类化合物，菟丝子和枸杞子的主要成分为黄酮。

因此，制备本发明药物的淫羊藿可以由淫羊藿甙，淫羊藿次甙 I，淫羊藿次甙 II 和淫羊藿糖甙 A 中的一种或一种以上代替，昆明山海棠可以由昆明山海棠当中的双萜类，三萜类和生物碱类化合物代替，菟丝子和枸杞子可以由其中所含的黄酮代替。

本发明药物（风湿平胶囊）经药效学研究证明，风湿平经灌服给药，可显著抑制大鼠佐剂性关节炎（AA）的原发及继发性损伤；明显抑制 2,4-二硝基氟苯（DNFB）所致小鼠耳迟发型超敏反应（DTH）；明显抑制小鼠溶血素抗体形成及小鼠巨噬细胞、脾细胞 IL-1、IL-2、IL-6、TNF 的活性；风湿平可显著抑制 ConA 诱导的淋巴细胞转化，对于 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 细胞，风湿平均可显著抑制，但以对的 CD<sub>4</sub> 的作用为强，对 CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 比值无明显影响。风湿平的上述作用均有显著的剂量-效应线性关系，12~18（生药）g/kg 为最低有效量。对于 NK 细胞，风湿平也有显著抑制活性。但风湿平在有效剂量下不引起胸腺、脾脏等免疫器官萎缩，也不抑制巨噬细胞吞噬活性。

对于炎症反应，风湿平有显著的抑制作用，能抑制醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性亢进，抑制巴豆油所致小鼠耳肿胀，抑制鹿角菜胶所致小鼠胸膜炎及大鼠 CMC 囊中白细胞的聚集，但对鹿角菜胶性大鼠足爪肿胀及棉球性肉芽组织增生，风湿平抑制的作用较弱。此外，对于醋酸所致小鼠扭体反应风湿平有明显抑制作用。

实验例 1：对佐剂性关节炎（AA）的影响

### 1.1 对大鼠 AA 的防治作用

SD 同窝大鼠 72 只雌雄各半，体重 180~220g，同源随机分为 6 组，每组 12 只，分笼饲养，每笼 6 只。用精密窄带尺量取大鼠左、右后爪踝

关节及足爪最大周径作为正常值, 分别灌服同体积不同剂量的药物或同体积西黄芪胶液, 药后 1h, 于各组大鼠左后足垫皮内注射弗氏完全佐剂 0.1ml / 只。每日灌服药物 1 次, 连续 30 天, 逐日同法量取大鼠左、右爪踝关节及足爪周径, 预防性给药试验以测量日鼠爪周径减去致炎前鼠爪周径计算肿胀度( $\Delta$  cm), 结果见表 1.1、1.2。到期称取体重及各组动物主要脏器重量, 结果见表 1.3、1.4。

1.1 风湿平对 AA 大鼠注射佐剂侧鼠爪踝关节肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	肿胀度( $\Delta$ cm)						
		1d	2d	3d	9d	12d	14d	16d
对照	-	0.69 $\pm$ 0.17	0.69 $\pm$ 0.12	0.92 $\pm$ 0.18	0.84 $\pm$ 0.41	1.10 $\pm$ 0.30	1.65 $\pm$ 0.68	2.10 $\pm$ 0.55
风湿平	7.5	0.74 $\pm$ 0.12	0.66 $\pm$ 0.074	0.83 $\pm$ 0.13	0.77 $\pm$ 0.27	1.11 $\pm$ 0.45	1.34 $\pm$ 0.53	1.91 $\pm$ 0.61
风湿平	15	0.80 $\pm$ 0.24	0.62 $\pm$ 0.13	0.76 $\pm$ 0.18	0.49 $\pm$ 0.17*	0.73 $\pm$ 0.34*	1.00 $\pm$ 0.48*	1.38 $\pm$ 0.67*
风湿平	30	0.75 $\pm$ 0.19	0.67 $\pm$ 0.19	0.87 $\pm$ 0.28	0.63 $\pm$ 0.22	0.73 $\pm$ 0.34*	0.82 $\pm$ 0.43**	1.05 $\pm$ 0.53**
昆明山海棠	5	0.72 $\pm$ 0.11	0.68 $\pm$ 0.16	0.91 $\pm$ 0.18	0.66 $\pm$ 0.23	0.88 $\pm$ 0.29	1.03 $\pm$ 0.36*	1.37 $\pm$ 0.33*
强的松	0.01	0.64 $\pm$ 0.14	0.64 $\pm$ 0.16	0.50 $\pm$ 0.26	0.46 $\pm$ 0.25	0.72 $\pm$ 0.46*	0.87 $\pm$ 0.46**	1.28 $\pm$ 0.69*

组别	剂量 (g/kg)	肿胀度( $\Delta$ cm)					
		18d	20d	22d	24d	26d	28d
对照	-	2.18 $\pm$ 0.44	2.05 $\pm$ 0.46	2.00 $\pm$ 0.46	2.04 $\pm$ 0.57	1.92 $\pm$ 0.65	1.83 $\pm$ 0.67
风湿平	7.5	1.74 $\pm$ 0.73	1.81 $\pm$ 0.55	1.81 $\pm$ 0.52	1.77 $\pm$ 0.55	1.65 $\pm$ 0.55	1.55 $\pm$ 0.49
风湿平	15	1.32 $\pm$ 0.59**	1.28 $\pm$ 0.58**	1.34 $\pm$ 0.61*	1.33 $\pm$ 0.67*	1.20 $\pm$ 0.64*	1.08 $\pm$ 0.58**
风湿平	30	0.95 $\pm$ 0.50**	0.87 $\pm$ 0.51**	0.95 $\pm$ 0.54**	0.89 $\pm$ 0.59**	0.90 $\pm$ 0.57**	0.86 $\pm$ 0.51**
昆明山海棠	5	1.47 $\pm$ 0.43**	1.50 $\pm$ 0.43**	1.49 $\pm$ 0.43*	1.42 $\pm$ 0.53*	1.40 $\pm$ 0.56*	1.32 $\pm$ 0.57
强的松	0.01	1.18 $\pm$ 0.7**6	1.03 $\pm$ 0.67**	1.05 $\pm$ 0.69*	0.90 $\pm$ 0.64**	0.86 $\pm$ 0.65**	0.85 $\pm$ 0.59**

与对照组相比 \*P<0.05, \*\*P<0.01(下同)

1.2 风湿平对 AA 大鼠注射佐剂侧鼠爪踝关节肿胀度的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	肿胀度( $\Delta$ cm)					
		2d	9d	12d	14d	16d	18d
对照	-	0.14 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.10	0.34 $\pm$ 0.36	0.80 $\pm$ 0.52	1.43 $\pm$ 0.67	1.36 $\pm$ 0.61
风湿平	7.5	0.18 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.14	0.26 $\pm$ 0.36	0.82 $\pm$ 0.52	1.31 $\pm$ 0.64	1.28 $\pm$ 0.71
风湿平	15	0.15 $\pm$ 0.08	0.02 $\pm$ 0.06	0.13 $\pm$ 0.10*	0.37 $\pm$ 0.31*	0.90 $\pm$ 0.56*	0.79 $\pm$ 0.60*
风湿平	30	0.18 $\pm$ 0.09	0.06 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.08*	0.29 $\pm$ 0.20**	0.49 $\pm$ 0.41**	0.33 $\pm$ 0.29**
昆明山海棠	5	0.16 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.10	0.44 $\pm$ 0.19**	0.87 $\pm$ 0.56*	0.84 $\pm$ 0.67*
强的松	0.01	0.20 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.08	0.21 $\pm$ 0.16	0.44 $\pm$ 0.43	0.99 $\pm$ 0.63	0.84 $\pm$ 0.74*

组别	剂量 (g/kg)	肿胀度( $\Delta$ cm)				
		20d	22d	24d	26d	28d
对照	-	1.28 $\pm$ 0.57	1.38 $\pm$ 0.64	1.35 $\pm$ 0.75	1.20 $\pm$ 0.78	1.12 $\pm$ 0.63
风湿平	7.5	1.33 $\pm$ 0.71	1.31 $\pm$ 0.73	1.27 $\pm$ 0.73	1.16 $\pm$ 0.73	1.07 $\pm$ 0.65
风湿平	15	1.74 $\pm$ 0.57*	1.92 $\pm$ 0.61*	0.95 $\pm$ 0.64*	0.88 $\pm$ 0.58*	1.83 $\pm$ 0.55
风湿平	30	0.27 $\pm$ 0.30**	0.34 $\pm$ 0.31**	0.32 $\pm$ 0.33**	0.31 $\pm$ 0.32**	0.34 $\pm$ 0.32**
昆明山海棠	5	0.82 $\pm$ 0.65*	0.89 $\pm$ 0.70*	0.80 $\pm$ 0.67*	0.83 $\pm$ 0.68	0.75 $\pm$ 0.69
强的松	0.01	0.82 $\pm$ 0.72*	0.79 $\pm$ 0.74*	0.75 $\pm$ 0.67**	0.68 $\pm$ 0.64*	0.71 $\pm$ 0.67

1.3 风湿平对 AA 大鼠体重变化的影响(x $\pm$ S)

组别	剂量 (g/kg)	体重变化(g)		
		起始体重	AA1 月时体重	体重增加
对照	-	228 $\pm$ 34	231 $\pm$ 52	3
	7.5	229 $\pm$ 34	220 $\pm$ 46	-9
风湿平	15	223 $\pm$ 40	232 $\pm$ 34	9
	30	224 $\pm$ 37	256 $\pm$ 60	32
昆明山海棠	5	226 $\pm$ 45	230 $\pm$ 43	4
强的松	0.01	264 $\pm$ 55	244 $\pm$ 31	-21

1.4 风湿平对 AA 大鼠免疫器官重量的影响(预防)(x $\pm$ S)

组别	剂量 (g/kg)	脏器系统(g 组织/100g 体重)			
		肝	脾	胸腺	肾上腺
对照	-	3.92 $\pm$ 0.65	0.34 $\pm$ 0.10	0.098 $\pm$ 0.040	0.027 $\pm$ 0.01
风湿平	7.5	3.73 $\pm$ 0.29	0.31 $\pm$ 0.09	0.078 $\pm$ 0.038	0.027 $\pm$ 0.008
风湿平	15	3.48 $\pm$ 0.32	0.38 $\pm$ 0.10	0.100 $\pm$ 0.034	0.023 $\pm$ 0.005
风湿平	30	3.38 $\pm$ 0.28*	0.44 $\pm$ 0.12*	0.100 $\pm$ 0.032	0.022 $\pm$ 0.007
昆明山海棠	5	3.21 $\pm$ 0.30**	0.36 $\pm$ 0.05	0.052 $\pm$ 0.011**	0.026 $\pm$ 0.009
强的松	0.01	3.04 $\pm$ 0.20**	0.32 $\pm$ 0.08	0.050 $\pm$ 0.060**	0.020 $\pm$ 0.004*

## 1.2 对大鼠 AA 的治疗作用

另有雄性 SD 大鼠 50 只随机分 5 组, 同法处理, 但药物于注射弗氏佐剂致炎后第 13 日开始灌服, 每日 1 次, 连续 2 周, 以测量日所测周径减去开始给药当日周径计算肿胀度( $\Delta$  cm), 结果见表 1.5、1.6, 主要脏器重量见表 1.7。

1.5 风湿平对 AA 大鼠注射佐剂侧鼠爪踝关节肿胀的治疗作用(x $\pm$ S)

组别	剂量 (g/kg)	肿胀( $\Delta$ cm)			
		1d	2d	4d	6d
对照	-	1.81 $\pm$ 0.27	1.92 $\pm$ 0.19	2.12 $\pm$ 0.22	2.16 $\pm$ 0.27
风湿平	7.5	1.68 $\pm$ 0.50	1.64 $\pm$ 0.54	1.70 $\pm$ 0.57	1.82 $\pm$ 0.61
风湿平	15	1.44 $\pm$ 0.41*	1.51 $\pm$ 0.36**	1.65 $\pm$ 0.34**	1.74 $\pm$ 0.31**
风湿平	30	1.50 $\pm$ 0.56	1.48 $\pm$ 0.41**	1.51 $\pm$ 0.44**	1.59 $\pm$ 0.51**
强的松	0.01	1.78 $\pm$ 0.51	1.70 $\pm$ 0.51	1.63 $\pm$ 0.50*	1.58 $\pm$ 0.50**

组别	剂量 (g/kg)	肿胀( $\Delta$ cm)			
		8d	10d	12d	14d
对照	-	1.92 $\pm$ 0.32	1.87 $\pm$ 0.34	1.92 $\pm$ 0.39	1.78 $\pm$ 0.44
风湿平	7.5	1.67 $\pm$ 0.68	1.60 $\pm$ 0.71	1.61 $\pm$ 0.77	1.58 $\pm$ 0.71
风湿平	15	1.46 $\pm$ 0.37**	1.48 $\pm$ 0.30*	1.28 $\pm$ 0.37**	1.22 $\pm$ 0.38**
风湿平	30	1.29 $\pm$ 0.58**	1.29 $\pm$ 0.65**	1.26 $\pm$ 0.67**	1.20 $\pm$ 0.68*
强的松	0.01	1.27 $\pm$ 0.46**	1.09 $\pm$ 0.54**	0.94 $\pm$ 0.50**	0.94 $\pm$ 0.42**



1.6 风湿平对 AA 大鼠注射佐剂对侧踝关节肿胀的治疗作用( $\bar{x} \pm S$ )

组别	剂量 (g/kg)	肿胀( $\Delta$ cm)			
		2d	4d	6d	8d
对照	-	0.36 $\pm$ 0.26	0.45 $\pm$ 0.25	0.55 $\pm$ 0.34	0.47 $\pm$ 0.29
风湿平	7.5	0.12 $\pm$ 0.25	0.34 $\pm$ 0.32	0.48 $\pm$ 0.41	0.28 $\pm$ 0.38
风湿平	15	0.21 $\pm$ 0.18	0.38 $\pm$ 0.27	0.44 $\pm$ 0.33	0.21 $\pm$ 0.33*
风湿平	30	0.10 $\pm$ 0.48	0.06 $\pm$ 0.28**	0.11 $\pm$ 0.24**	0.06 $\pm$ 0.27**
强的松	0.01	0.10 $\pm$ 0.13*	0.15 $\pm$ 0.28*	0.11 $\pm$ 0.25**	-0.08 $\pm$ 0.34**

组别	剂量 (g/kg)	肿胀( $\Delta$ cm)		
		10d	12d	14d
对照	-	0.48 $\pm$ 0.25	0.46 $\pm$ 0.31	0.40 $\pm$ 0.36
风湿平	7.5	0.35 $\pm$ 0.30	0.30 $\pm$ 0.29	0.30 $\pm$ 0.35
风湿平	15	0.19 $\pm$ 0.45*	0.06 $\pm$ 0.31**	-0.06 $\pm$ 0.34**
风湿平	30	0.02 $\pm$ 0.39**	0.05 $\pm$ 0.38*	-0.02 $\pm$ 0.41**
强的松	0.01	-0.13 $\pm$ 0.28**	-0.26 $\pm$ 0.36**	-0.33 $\pm$ 0.39**

n = 10, 与对照组相比, \*P<0.05, \*\*P<0.01

1.7 风湿平对 AA 大鼠体重及免疫器官重量的影响( $\bar{x} \pm S$ )

组别	剂量 (g/kg)	脏器系数(g 组织/100g 体重)			
		肝	脾	胸腺	肾上腺
对照	-	0.35 $\pm$ 0.23	0.35 $\pm$ 0.061	0.073 $\pm$ 0.014	0.026 $\pm$ 0.0071
风湿平	7.5	3.21 $\pm$ 0.52	0.33 $\pm$ 0.091	0.071 $\pm$ 0.026	0.024 $\pm$ 0.0085
风湿平	15	3.40 $\pm$ 0.54	0.36 $\pm$ 0.014	0.067 $\pm$ 0.022	0.023 $\pm$ 0.0048
风湿平	30	2.79 $\pm$ 0.43	0.32 $\pm$ 0.083	0.069 $\pm$ 0.029	0.023 $\pm$ 0.0072
昆明山海棠	5	3.92 $\pm$ 0.59	0.35 $\pm$ 0.100	0.075 $\pm$ 0.034	0.027 $\pm$ 0.0060
强的松	0.01	3.52 $\pm$ 0.35	0.28 $\pm$ 0.047*	0.05 $\pm$ 0.011**	0.02 $\pm$ 0.0043*

由表 1.1、1.2、1.3 及表 1.5、1.6 可见, 风湿平对佐剂性关节炎大鼠注射佐剂侧的原发和注射佐剂对侧的继发性关节损伤均有强的抑制作用, 致炎同时或致炎后 2 周开始给药均有显著效果, 表明风湿平对大鼠佐剂性关节炎有显著的预防和治疗作用。分析风湿平对大鼠后肢踝关节处特异性免疫性肿胀及鼠爪非特异性肿胀的影响可见, 风湿平的作用以对踝关节肿胀的作用为强, 表明风湿平主要作用于免疫性炎症反应。

表 1.3、1.4 及 1.7 结果表明, AA 大鼠于整个实验期间体重无明显增长, 而风湿平在有效剂量下可见大鼠体重增加, 强的松治疗、预防组均可见大鼠体重下降, 胸腺、肾上腺明显萎缩, 单味昆明山海棠也可见胸腺萎缩, 但风湿平三个剂量均未见对胸腺、肾上腺重量有明显影响。

### 1.3 对大鼠 AA 治疗作用的病理学观察

SD 大鼠 45 只分 6 组，体重 180 20g，用弗氏佐剂形成 AA 后用风湿平灌胃治疗，连续 5 天，末次药后 1h，评价并计算大鼠关节指数。并取大鼠继发性损伤侧后肢关节用甲醛固定，HE 染色，显微镜下观察关节滑膜及软骨的改变。各组大鼠关节指数结果见表 1.8。

1.8 风湿平对大鼠 AA 关节指数的影响( $\bar{x} \pm S$ )

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	关节指数
对照组	—	8	0**
AA 模型组	—	7	6.2 $\pm$ 0.49
风湿平	7.5	9	4.86 $\pm$ 0.90**
风湿平	15	7	4.71 $\pm$ 0.95**
风湿平	30	7	4.56 $\pm$ 1.13**
雷公藤多甙	0.006	7	4.57 $\pm$ 0.79**

与模型组相比\*\*P<0.01

关节指数根据大鼠每个关节红肿程度分别评分为 0—4 分，四肢分数之和即为关节指数。四肢及关节评分标准如下：0 分=正常，1 分=仅红，2 分=红、轻肿，3 分=严重肿，4 分=关节变形、强直。

显微镜下观察可见，模型组大鼠后肢关节滑膜层增生，胶原纤维增多，淋巴细胞及浆细胞浸润，形成明显肉芽肿；滑膜细胞变性，胞浆红染，胞核固缩，部分区域滑膜上皮脱落；软骨萎缩，表面粗糙，凹凸不平，软骨细胞有轻度增生。给予风湿平各剂量组治疗后，可见关节滑膜组织炎症减轻，形成较多胶原纤维；滑膜细胞部分脱落；软骨表层细胞增生，表面变平，软骨处于修复状态。

对照组大鼠，可见滑膜层增生，胶原纤维增多，淋巴细胞及浆细胞浸润，形成明显肉芽肿，滑膜细胞变性，胞浆红染，胞核固缩，部分区域滑膜上皮脱落。风湿平治疗组，关节滑膜组织炎症减轻，形成较多胶原纤维，滑膜细胞部分脱落，软骨表层细胞增生，表面变平，软骨处于修复状态。

实施例 2 对 2,4-二硝基氟苯(DNFB)所致小鼠耳迟发型超敏反应(DTH)的影响 NIH 小鼠 50 只,雌雄各半,随机分为 5 组,各鼠于腹部去毛部位用 1% 的 DNFB 丙酮溶液 0.025ml / 只致敏,隔日同法强化 1 次,于致敏后第 5 日,于小鼠右耳涂以 1% 的 DNFB 食用油溶液 0.01ml / 只攻击,24h 鼠将小鼠处死,按法于扭力天平称取左、右耳片重量,以其差值(mg)作为小鼠 DTH 反应的强度。实验以不同免疫、给药程序进行。

## 2.1 全程给药对 DTH 的影响

免疫、给药程序如下:

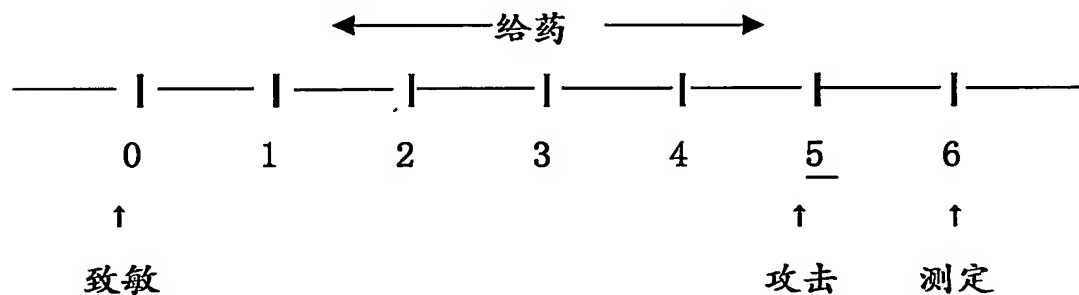


表 2.1, 风湿平对 NIH 小鼠 DNFB 所致小鼠迟发超敏反应的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	给药时间 (天)	鼠数 (只)	耳肿胀百分率(%)	抑制率 (%)	P 值
对照			10	34.20 $\pm$ 3.77		
风湿平	27	0~5	10	26.24 $\pm$ 3.34	23.3	<0.01
风湿平	40	0~5	10	12.99 $\pm$ 4.96	62.0	<0.01
风湿平	60	0~5	10	10.43 $\pm$ 7.53	69.5	<0.01
地塞米松	0.003	0~5	10	13.93 $\pm$ 4.41	59.3	<0.01
对照			10	42.43 $\pm$ 5.28		
风湿平	40	-2~0	10	31.50 $\pm$ 10.52	25.0	<0.01
风湿平	40	-2~2	10	30.88 $\pm$ 7.92	27.2	<0.01
风湿平	40	-2~5	10	21.07 $\pm$ 4.62*	50.3	<0.01
风湿平	40	5~6	10	32.00 $\pm$ 9.37	41.7	<0.01
环磷酰胺	0.05	-2~2	10	39.40 $\pm$ 10.78	8.1	>0.05
环磷酰胺	0.05	-2~0	10	37.47 $\pm$ 6.71	11.7	>0.05
对照			10	38.50 $\pm$ 4.67		
Cy	0.1 $\times$ 3	0、2、4 日各 1 次	10	23.00 $\pm$ 7.65	40.3	<0.01
Cy	0.25	-3d	10	41.84 $\pm$ 7.75	-8.7	
风湿平	60	0~4	10	27.20 $\pm$ 10.20	29.4	<0.01
Cy + 风湿平	0.25 + 60	-3,0~4	10	38.07 $\pm$ 6.65	1.1	

\*与其它各组比较 P<0.05 或 P<0.01

由表 2.1 结果可见, 风湿平对 DNFB 所致小鼠 DTH 有显著的抑制作用, 其抑制作用强度有显著的剂量相关性, 剂量加大作用增强, 至 60.9g/kg 可使 DTH 的抑制率达 69.5%。

## 2.2 不同给药时间对小鼠 DTH 的影响

免疫、给药程序及结果见表 2.1 中栏和下半栏, 由表中栏可见, 致敏前 2 日至致敏当日、致敏前 2 日至致敏后 2 日、致敏前 2 日至致敏后 5 日、攻击前后给药均可显著抑制小鼠 DTH 反应, 但以致敏前加致敏后全程给药, 即致敏前 2 日至致敏后 5 日给药抑制作用尤强, 提示风湿平抑制 DTH 的作用环节和机制可能既与抑制 DTH 反应的早期参予细胞, 也抑制 DTH 晚期的效应细胞以及 DTH 反应中期细胞有关, 而与环磷酰胺有不同, 环磷酰胺于致敏前 2 日给药至致敏当日或致敏后 2 日, 在较小剂量均不影响 DTH 反应。

由表 2.1 下栏可见, 于致敏前 3 日 1 次给予大剂量的环磷酰胺, 由于对 Ts 细胞的强烈抑制而使 Th 细胞功能相对亢进, 表现为对小鼠 DTH 反应非但不抑制, 反而有所增强, 此时如与有显著 DTH 抑制效果的风湿平合用, 则可抵消风湿平的抑制效果, 提示风湿平抑制 DTH 反应的作用机理与环磷酰胺不同, 有可能其对 TH 细胞的抑制作用相对敏感。

## 实验例 3 对体液免疫的影响

### 3.1 对鸡红细胞(CRBC)免疫所致正常小鼠溶血素抗体生成的影响

18~22g 小鼠 190 只, 雌雄各半, 随机分为 19 组, 各组小鼠均 ip5% CRBC0.2ml 免疫, 于免疫后 7 天, 拔除眼球取血, 用生理盐水稀释后测定风湿平对各组小鼠溶血素抗体形成的影响, 风湿平于免疫的不同时间开始灌服, 结果见表 3.1、3.2、3.3。

表 3.1 风湿平对 NIH 小鼠溶血素抗体生成的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	给药 时间	鼠数 (只)	溶血素值	抑制率 (%)	P 值
对照			10	169.0 $\pm$ 62.0		
风湿平	18	0~7	10	46.0 $\pm$ 5.6	72.8	<0.01
风湿平	27	0~7	10	35.4 $\pm$ 2.0	79.1	<0.01
风湿平	40	0~7	10	28.2 $\pm$ 5.9	83.3	<0.01
风湿平	60	0~7	10	16.7 $\pm$ 3.0	90.1	<0.01
昆明山海棠	13.3	0~7	10	121.0 $\pm$ 88.0**	28.4	<0.015
环磷酰胺	0.02	0~7	10	35.0 $\pm$ 2.0	79.3	<0.01

\*\*与相同昆明山海棠含量的风湿平(40g/kg)相比 P&lt;0.01

表 3.2 风湿平对 ICR 小鼠溶血素抗体生成的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	给药 时间	鼠数 (只)	溶血素值	抑制率 (%)	P 值
对照	-	-	10	124.70 $\pm$ 42.60		
风湿平	12	0~7	10	75.00 $\pm$ 53.10	39.9	<0.05
风湿平	18	0~7	10	45.60 $\pm$ 22.70	63.4	<0.01
风湿平	27	0~7	10	29.10 $\pm$ 22.10	76.8	<0.01
风湿平	40	0~7	10	28.20 $\pm$ 5.30	77.4	<0.01
昆明山海棠	6.0	0~7	10	143.50 $\pm$ 67.90**		>0.05
环磷酰胺	0.02	0~7	10	27.80 $\pm$ 6.60	77.9	<0.01

\*\*与同剂量风湿平(18g/kg)相比 P&lt;0.01

表 3.3 风湿平对 ICR 小鼠溶血素抗体生成的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	给药 时间	鼠数 (只)	溶血素值	抑制率 (%)	P 值
对照	-	-	10	256.0 $\pm$ 26.0		
风湿平	18	-7~7	10	198.0 $\pm$ 50.0	22.7	<0.01
风湿平	18	-3~7	10	156.0 $\pm$ 85.0	39.1	<0.01
风湿平	18	0~7	10	98.0 $\pm$ 35.0	61.7	<0.01
环磷酰胺	0.02	0~7	10	25.0 $\pm$ 4.0	90.2	<0.01

从上列 3 表所示结果可见, 风湿平对不同种系小鼠溶血素抗体形成均有显著抑制作用, 并随剂量加大, 作用增强, 有良好的剂量一效应关系, 最低抑制剂量为 12g/kg, 与风湿平组成主药之一的昆明山海棠相比, 对抗体形成的抑制作用明显为强, 表 3.1 结果示风湿平的作用强度约为其 2.25 倍以上(13.5g/kg 昆明山海棠的作用较含 6g/kg 昆明山海棠的风湿平的作用为弱)。

### 3.2 对 AA 小鼠体液免疫功能的影响

NIH 小鼠体重 20 $\pm$ 2g, 每鼠右后足跖皮内注射弗氏完全佐剂 0.05ml,

3周后形成AA模型小鼠，随机分6组后，分别灌服不同药物5天，于开始给药同时 ip10% 绵羊红细胞(SRBC)0.5ml 致敏，5天后处死，取脾用Hank's液冲洗后制备淋巴细胞悬液，调整细胞浓度为  $2 \times 10^7 / \text{ml}$ ，取1ml加于试管中，加0.2% SRBC1ml和1:30补体1ml，37℃水浴箱内孵育1小时，2000rpm离心5分钟，取上清液，用722分光光度计于415nm波长测其光密度，代表PFC量。

另取上述致敏小鼠血，分离血清，以凝集试验测定其抗体效价，以Log2值表示，结果见表3.4。

表3.4 风湿平对AA小鼠体液免疫功能的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	PFC (OD)	IgM(Log <sub>2</sub> )
对照组	—	8	0.819 $\pm$ 0.013#	6.875 $\pm$ 0.641
AA模型组对照	—	10	0.940 $\pm$ 0.019**	7.700 $\pm$ 0.599*
风湿平	5	8	0.834 $\pm$ 0.012**#	6.875 $\pm$ 0.641#
风湿平	10	8	0.834 $\pm$ 0.012**#	6.750 $\pm$ 0.886#
风湿平	20	8	0.830 $\pm$ 0.014**#	6.375 $\pm$ 0.518##
雷公藤多甙	0.012	10	0.835 $\pm$ 0.015**#	6.950 $\pm$ 0.597#

与对照组比较\*P<0.05, \*\*P<0.01; 与模型组比较# P<0.05, ## P<0.01

由表3.4可见，AA小鼠PFC、IgM均显著高于正常小鼠，风湿平可显著降低AA小鼠脾脏抗体生成细胞(PFC)及抗体(IgM)生成量。

#### 实验例4 对大鼠被动皮肤过敏反应(PCA)的影响

取大鼠肌注卵白蛋白10mg/kg，同时腹腔注射百日咳杆菌  $2 \times 10^{10} / 0.2\text{ml}$  免疫，2周后处死大鼠，取血分离血清备用。

另取体重150~200g大鼠60只，雌雄各半，随机分为6组。于乙醚轻度麻醉下，于鼠背剪毛部位皮内注射上述抗卵蛋白血清(1:5、1:10稀释，分别示为d<sub>1</sub>、d<sub>2</sub>)0.1ml，每稀释度2点。48h后用含卵白蛋白1mg的0.5%依文思蓝生理盐水溶液1ml iv攻击，20min后将大鼠断头处死，翻转鼠背皮肤，根据蓝斑色泽深浅及面积，多人按染料渗出强弱评定蓝斑级别，然后将蓝染皮肤剪碎，浸泡于5ml 0.1%硫酸钠丙酮(7:3)液中，48

小时后离心, 取上清于 590nm 测定光密度, 计算各组大鼠 PCA 反应强度及抑制百分率, 结果见表 4。

表 4 风湿平对大鼠 PCA 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	分值		吸光度	
		d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>
对照	-	5.60 $\pm$ 1.78	2.40 $\pm$ 2.46	0.191 $\pm$ 0.129	0.096 $\pm$ 0.106
风湿平	12	7.50 $\pm$ 2.51	4.20 $\pm$ 2.49	0.402 $\pm$ 0.213*	0.192 $\pm$ 0.175
风湿平	24	7.10 $\pm$ 2.13	4.10 $\pm$ 1.79	0.310 $\pm$ 0.177	0.137 $\pm$ 0.099
风湿平	48	6.00 $\pm$ 1.83	1.70 $\pm$ 1.95	0.121 $\pm$ 0.109	0.024 $\pm$ 0.026*
昆明山海棠	8	6.11 $\pm$ 1.27	2.56 $\pm$ 1.67	0.223 $\pm$ 0.122	0.074 $\pm$ 0.045
酮替芬	0.1	2.78 $\pm$ 1.64**	0.67 $\pm$ 1.41	0.033 $\pm$ 0.024**	0.027 $\pm$ 0.019*

与对照组相比 \*P<0.05, \*\*P<0.01

由表 4 可见, 风湿平对大鼠 PCA 抑制作用弱, 仅在较大剂量时与对照相比有显著差异。

## 实验例 5 对细胞因子的影响

### 5.1 对小鼠 TNF $\alpha$ 、IL-2 的影响

ICR 小鼠体重 18~22g, 雄雌各半 60 只, 随机分为 6 组, 分别灌服不同剂量的风湿平或其它药物, 每日 1 次, 连续 10 天, 末次药后 24 小时, 无菌条件下取小鼠腹腔巨噬细胞或脾细胞, 用 Hank's 液洗涤 2 次, 无血清 RPMI 1640 液洗 1 次, 用 5% FCS-RPMI 1640 液调制为  $2 \times 10^8$  / ml 细胞悬液, 分别加入 LPS 10ng / ml 或 ConA 10ng / ml, 于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 48h, 按法测定 TNF $\alpha$  或 IL-2。

#### TNF $\alpha$ 的测定:

小鼠抗 TNF- $\alpha$  单克隆抗体包被板条, 恢复室温后加入培养上清 50  $\mu$ l/孔, 60 分钟, 加生物素标记抗体, 25℃ 2h, 加酶标亲和素, 30 分钟, 加底物 30 分钟, 加终止液, 450nm 波长测 OD 值。根据 OD 值在标准曲线上计算 TNF- $\alpha$  含量 (ng / ml)。

#### IL-2 的测定:

取对数生长期、IL-2 依赖性生长的 CTLL 细胞, 用 5% FCS-RPMI1640

调制成  $1 \times 10^5/\text{ml}$  细胞悬液。在 96 孔平底细胞培养板中加入 CTLL 细胞悬液  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，培养上清液  $100 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，每份样品作 3 复孔，同时作不同稀释度标准 rHIL-2 和培养液对照。37℃ 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 小时，终止培养前 6 小时离心，去上清  $110 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，加入 MTT  $10 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，37℃，3h 测 OD 570nm 和 OD 630nm 值，每孔 OD 值 = OD570nm - OD630nm。

$$\text{IL-2 活性} = \frac{\text{样品 OD} - \text{培养液对照 OD}}{\text{标准品 OD} - \text{培养液对照 OD}} \times \text{标准品活性单位 (IU/ml)}$$

表 5.1 风湿平对 TNF 及 IL-2 的影响(x $\pm$ s)

药照	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	TNF (pg/ml)	IL-2 (IU/ml)
对照	-	10	87.80 $\pm$ 4.63	26.30 $\pm$ 4.22
	12	10	62.14 $\pm$ 13.13**	16.00 $\pm$ 2.89**
风湿平	24	10	58.60 $\pm$ 9.63**	18.80 $\pm$ 2.86**
	36	10	54.40 $\pm$ 10.88**	18.20 $\pm$ 2.86**
昆明山海棠	8	10	58.25 $\pm$ 10.32**	16.00 $\pm$ 2.88**
环磷酰胺	0.02	10	42.20 $\pm$ 9.57**	10.10 $\pm$ 3.00**

\*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

表 5.1 结果表明，风湿平对 TNF $\alpha$  有显著的抑制效果，12g/kg 可见有非常显著的抑制作用，剂量加大作用增强，但剂量一效应曲线平缓。对于 IL-2，风湿平也有显著抑制作用，但剂量一效应关系不明显。

## 5.2 对 IL-1、IL-6 的影响

NIH 小鼠体重 18~22g，雌雄各半，70 只随机分为 7 组，分别灌服不同剂量的风湿平或其它药物，每日 1 次，连续 10 天，末次药后 24 小时处死，按法取腹腔巨噬细胞及脾细胞，测定 IL-1 及 IL-6。

IL-1 的测定：

无菌条件下取腹腔巨噬细胞，用 Hank's 液洗涤两次，无血清 RP-MI1640 洗涤一次，用 5% FCS-RPMI 1640 调制成  $4 \times 10^6/\text{ml}$  细胞悬液，



取 1ml 于康氏管中, 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 小时, 弃未粘附细胞, 加入 5% FCS-RPMI 1640 和 LPS (10ng/ml), 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 小时, 反复冻融, 4℃ 保存。另取 C57 小鼠, 在无菌条件下取胸腺细胞, 用 5% FCS-RPMI1640 调制成  $1 \times 10^6$ /ml 细胞悬液。

取胸腺细胞悬液和冻融上清各 100  $\mu$ l 加入 96 孔平底细胞培养板, 每份样品作三复孔, 同时作不同稀释度标准品 rHIL-1 和培养液对照, 然后加入 ConA 2ng/孔, 平板置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件培养 72 小时, 于终止培养前 14 小时加入 <sup>3</sup>H-TdR 0.1  $\mu$  Ci/孔, 用多头细胞收集仪收集细胞, 测 cpm 值。

$$\text{IL-1 活性} = \frac{\text{样品 cpm} - \text{培养液对照 cpm}}{\text{标准品 cpm} - \text{培养液对照 cpm}} \times \text{标准品活性单位 (ng/ml)}$$

IL-6 的测定:

无菌条件下取小鼠脾细胞, 用 Hank's 液洗涤两次, 无血清 RPMI1640 洗涤一次, 用 5% FC~ RPMI 1640 调制成  $2 \times 10^6$ /ml 细胞悬液, 取 1ml 于康氏管中, 加入 ConA (10ng/ml), 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 小时。

取对数生长期、IL-6 依赖性生长的 MH60 细胞, 用 5% FC-RPMI1640 调制成  $1 \times 10^5$ /ml 细胞悬液。

在 96 孔平底细胞培养板中加入 MH60 细胞悬液 100  $\mu$ l/孔、培养上清液 25  $\mu$ l/孔, 用 5% FCS-RPMI 1640 补足 200  $\mu$ l/孔, 每份样品作三复孔, 同时作不同稀释度标准 rHIL-6 和培养液对照。37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 72 小时, 终止培养前 6 小时离心, 去上清 110  $\mu$ l/孔, 加入 MTT 10  $\mu$ l/孔, 37℃ 3 小时, 测 OD<sub>570nm</sub> 和 OD<sub>630nm</sub> 值, 每孔 OD 值 = OD<sub>570nm</sub> - OD<sub>630nm</sub>。

$$\text{IL-2 活性} = \frac{\text{样品 OD} - \text{培养液对照 OD}}{\text{标准品 OD} - \text{培养液对照 OD}} \times \text{样品稀释度} \times \text{标准品活性单位 (IU/ml)}$$

表 5.2 对小鼠 IL-1、IL-6 的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	IL-1 (ng/ml)	IL-6 (IU/ml)
对照	-	10	78.7 $\pm$ 7.1	94.6 $\pm$ 6.8
	7.5	10	59.3 $\pm$ 4.9**	64.9 $\pm$ 4.8**
	15	10	53.3 $\pm$ 5.7**	60.5 $\pm$ 4.3**
	30	10	54.4 $\pm$ 4.8**	56.0 $\pm$ 4.6**
	60	10	47.0 $\pm$ 6.6**	56.6 $\pm$ 6.1**
昆明山海棠	5	10	57.6 $\pm$ 4.7**	65.7 $\pm$ 4.9**
环磷酰胺	0.02	9	44.5 $\pm$ 7.7	49.6 $\pm$ 6.7**

由表可见, 风湿平对小鼠腹腔巨噬细胞生成 IL-1 及脾细胞生成 IL-6 均有强的抑制作用, 并随剂量加大, 作用增加。

### 5.3 对佐剂性关节炎大鼠血浆 NO 的影响

SD 大鼠 160 ~ 200g 雌雄各半, 60 只随机分为 6 组: 空白对照组, 每鼠右后足跖皮内注射 NS 0.5ml; 模型组及风湿平高、中、低剂量组及雷公藤多甙组, 每鼠右后足跖皮内注射弗氏完全佐剂 (FCA) 0.5ml。于造模 18 天形成大鼠佐剂性关节炎 (AA) 后开始灌胃给药, 每天 1 次, 连续 5 天, 空白对照组和模型组给予蒸馏水; 高、中、低剂量组分别给予高、中、低剂量的风湿平, 阳性对照组给予雷公藤多甙片。末次药后 1 小时腹主动脉取血 2ml, 分离血浆, -70℃ 保存待测。NO 的测定按 NO 试剂盒说明书进行: 取血浆 0.1ml 加 0.6ml C 试剂混匀, 加双蒸水 0.4ml, 混匀, 加 0.1ml D 试剂混匀, 冰上孵育 60min, 12000 转离心 2min, 取上清 0.6ml 加 0.4ml 双蒸水及 0.1ml A 试剂, 冰水孵育 15min 之后, 加 0.1ml B 试剂, 室温放置 1 小时, 545nm 比色读 OD 值。根据样品 OD 值, 按标准曲线计算 NO 含量, 结果见表 5.3。

表 5.3 风湿平对佐剂性关节炎大鼠血浆 NO 的影响(x $\pm$ s)

分别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	NO 含量 ( $\mu$ mol/L)	y (y=Lgx)
对照组	-	8	13.55 $\pm$ 1.11*	1.131 $\pm$ 0.032
AA 模型组	-	9	17.56 $\pm$ 4.15	1.235 $\pm$ 0.097
风湿平	12	7	9.83 $\pm$ 2.58*** $\Delta$	0.985 $\pm$ 0.087
风湿平	24	7	10.12 $\pm$ 1.56*** $\Delta$	1.001 $\pm$ 0.067
风湿平	48	7	10.70 $\pm$ 1.51*** $\Delta$	1.026 $\pm$ 0.062
雷公藤多甙	0.006	7	15.25 $\pm$ 3.48	1.173 $\pm$ 0.099

与模型组比较\*P<0.05, \*\*P<0.01; 与雷公藤多甙比较 $\Delta$  P<0.01

由表 5.3 可见, 模型组大鼠血浆 NO 水平显著高于空白对照组, 风湿平可显著降低 AA 大鼠血浆 NO 水平, 雷公藤多甙片也可降低关节炎大鼠血浆 NO 水平, 但作用明显为弱。

#### 实验例 6 对小鼠 T 淋巴细胞、CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 及 NK 细胞的影响

##### 6.1 对正常小鼠淋巴细胞转化的影响

NIH 小鼠 80 只雌雄各半, 随机分 8 组, 分别灌服不同药物, 每天 1 次, 连续 10 天, 末次药后 24 小时小鼠处死, 无菌条件下取小鼠脾细胞, 用 Hank's 液洗涤两次, 无血清 RPM11640 洗涤一次, 用 5% FCS-RP-MI1640 调制成  $2 \times 10^6$ /ml 细胞悬液。将细胞悬液加入 96 孔平底细胞培养板, 100g  $\mu$ l/孔, 每份作 3 复孔, 其中 2 孔加刺激剂 (ConA2ng/孔) 作为转化孔, 另 1 孔不加刺激剂, 作为对照孔。平板置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 条件培养 72 小时, 终止培养前 14 小时, 加入 <sup>3</sup>H-TdR 0.1  $\mu$  Ci / 孔。用多头细胞收集仪收集细胞, 测 cpm 值, 计算复孔平均值。直接用各组 cpm 或刺激指数进行比较, 刺激指数按下式计算:

$$\text{刺激指数} = \frac{\text{刺激 cpm}}{\text{对照 cpm}}$$

结果见表 6.1。

表 6.1 对 ConA 致小鼠淋巴细胞转化的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	cpm	刺激指数
对照	-	10	20433 $\pm$ 3579	25.87 $\pm$ 3.06
风湿平	7.5	10	13566 $\pm$ 1779**	27.29 $\pm$ 7.67
	15	10	12708 $\pm$ 1692**	18.04 $\pm$ 3.76
	30	10	12809 $\pm$ 2575**	16.17 $\pm$ 4.37
	60	10	12090 $\pm$ 1706**	19.05 $\pm$ 3.80
昆明山海棠	2.5	10	18038 $\pm$ 3359	17.11 $\pm$ 2.60
	5	10	12081 $\pm$ 1039**	17.58 $\pm$ 4.37
环磷酰胺	0.02	9	9922 $\pm$ 1145**	13.66 $\pm$ 2.28

与对照相比 \*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

由表 6.1 可见, 风湿平对 ConA 刺激下的淋巴细胞转化有显著的抑制作用, 并呈一定的量—效关系。

## 6.2 对正常小鼠 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 及 NK 细胞的影响

实验同 5.1, 停药 24 小时后用 5% FCS-RPIM1640 制备小鼠脾细胞悬液, 调细胞数为  $2 \times 10^8$ /ml 按法测定 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 及其比值和 NK 细胞。

CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 的测定:

取小鼠脾细胞悬液 50  $\mu$ l, 加在经多聚赖氨酸铺底的玻片上制成细胞涂片。用经尼绒毛分离的小鼠 T 细胞为阳性对照。细胞涂片经丙酮固定后用正常小鼠血清封闭, 加入生物素标记的抗 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 抗体, 37℃ 孵育 2 小时, 加酶标亲和素, 室温 10 分钟, 加底物 10 分钟, 洗涤, 苏木精复染 2 分钟。梯度酒精脱水后, 明胶甘油封片, 高倍显微镜下数 200 个细胞。

$$\text{细胞含量} = \frac{\text{着色细胞数}}{200} \times 100\%$$

NK 细胞的测定:

EC 细胞制备: 无菌条件下取小鼠脾细胞, 用 Hank's 液洗涤两次, 无血清 RPMI1640 洗涤一次, 用 5% FCS-RPMI1640 调制成  $2 \times 10^8$ /ml 细胞悬液, 作为 EC。

TC 细胞制备：对数生长期、小鼠 NK 细胞敏感的 Yack-1 细胞调制成  $4 \times 10^4/\text{ml}$  细胞悬液，作为 TC。

测定：取 EC 和 TC 各  $100 \mu\text{l}$  加入 96 孔平底细胞培养板，每份样品作 3 复孔，同时作 EC 和 TC 对照 (EC 对照：EC  $100 \mu\text{l} + 5\%$  FCS RPMI 1640  $100 \mu\text{l}$ ；TC 对照：TC  $100 \mu\text{l} + 5\%$  FCS RPMI 1640  $100 \mu\text{l}$ )。37℃ 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 小时，终止培养前 6 小时离心，去上清  $110 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，加入 MTT  $10 \mu\text{l}/\text{孔}$ ，37℃ 3 小时测 OD570nm 和 OD630nm 值，每孔 OD 值 = OD570nm - OD630nm。

$$\text{NK 活性} = \left( 1 - \frac{\text{样品 OD} - \text{EC 对照 OD}}{\text{TC 对照 OD}} \right) \times 100\%$$

表 6.2 风湿平对  $\text{CD}_4$ 、 $\text{CD}_8$ 、NK 细胞的影响(x ± s)

药物	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	$\text{CD}_4$ (%)	$\text{CD}_8$ (%)	$\text{CD}_4/\text{CD}_8$	NK
对照	-	10	20.80 ± 2.94	14.80 ± 2.49	1.42 ± 0.18	40.13 ± 4.89
	12	10	19.14 ± 2.91	13.43 ± 2.51	1.43 ± 0.08	31.94 ± 4.52**^A
风湿平	24	10	17.30 ± 2.51**	12.00 ± 2.40	1.46 ± 0.16	35.36 ± 3.40**^A
	36	10	16.30 ± 2.50**	11.23 ± 2.94**	1.49 ± 0.20	31.06 ± 3.53**^A
昆明山海棠	8	10	16.25 ± 2.25**	11.50 ± 2.45	1.44 ± 0.18	32.20 ± 2.00**
环磷酰胺	0.02	10	11.50 ± 2.50**	4.10 ± 1.20**	2.91 ± 0.53**	23.10 ± 3.66**

与对照组比较 \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与 Cy 比较 ^P<0.01

从表 6.2 可见，风湿平对  $\text{CD}_4$ 、 $\text{CD}_8$  细胞均有一定抑制作用，也呈现剂量—效应关系，但剂量—效应曲线很平缓。对  $\text{CD}_4$  的抑制有效剂量为 24g/kg，而对  $\text{CD}_8$  细胞则于 36g/kg 高剂量才有显著抑制作用。相应，对  $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  比值，风湿平无明显影响。环磷酰胺则对  $\text{CD}_4$ 、 $\text{CD}_8$  均有强的抑制作用，而对  $\text{CD}_8$  的作用尤强，结果导致  $\text{CD}_4/\text{CD}_8$  比值大为增高。

对于 NK 细胞，风湿平也有显著抑制效果，但量—效关系不明确，而环磷酰胺则有强烈的抑制作用，20mg/kg 与 12、24、36g/kg 风湿平的作

用相比, 均有非常显著的差异。

### 6.3 对 AA 小鼠 T 淋巴细胞数和功能的影响

20  $\pm$  2gNIH 小鼠每鼠右后足跖皮内注射 Freund' s 完全佐剂 0.05ml, 三周后制成佐剂性关节炎模型。阴性对照组每鼠右后足跖皮内注射生理盐水 0.05ml。灌服给药, 每日 1 次, 连续 5 日。5 天后分别取各组小鼠外周血推血片, 进行酯酶染色。油镜下观察酯酶染色阳性细胞百分率(即外周血中 T 细胞的百分率)。小鼠麻醉后, 取脾脏制成单细胞悬液, PBS 洗一次, 弃上清, 加红细胞溶解液 4ml, 充分摆动 2~3min 待红细胞完全溶解后, 离心弃上清, 荧光洗液洗二次, 离心后弃上清, 调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$ /ml, 每管分别加入 50  $\mu$ l 稀释抗 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub> 抗体, 4℃ 孵育 1 小时, 荧光洗液洗两次后加固定液 2ml。400 目网过滤至 FCA 管, 上流式细胞仪分析, 结果见表 6.3。

表 6.3 对佐剂性关节炎小鼠 T 细胞的影响(x  $\pm$  s)

分组	剂量 (g/kg)	ANAE+ (%)	CD4+ (%)	CD8 (%)	CD4+/CD8+
对照组	-	50.60 $\pm$ 4.25	26.13 $\pm$ 1.16	15.56 $\pm$ 0.68	1.68 $\pm$ 0.03
AA 模型组	-	49.00 $\pm$ 4.22 <sup>*</sup>	32.56 $\pm$ 2.87 <sup>**</sup>	13.59 $\pm$ 1.03 <sup>**</sup>	2.49 $\pm$ 0.16 <sup>**</sup>
	7.5	49.13 $\pm$ 4.03 <sup>*</sup>	27.30 $\pm$ 1.76 <sup>##</sup>	15.98 $\pm$ 1.11 <sup>##</sup>	1.71 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>
风湿平	15	49.31 $\pm$ 3.29 <sup>*</sup>	27.96 $\pm$ 1.67 <sup>##</sup>	16.23 $\pm$ 1.27 <sup>##</sup>	1.73 $\pm$ 0.05 <sup>##</sup>
	30	48.56 $\pm$ 3.23 <sup>*</sup>	26.75 $\pm$ 1.94 <sup>##</sup>	15.58 $\pm$ 1.29 <sup>##</sup>	1.72 $\pm$ 0.04 <sup>##</sup>
雷公藤多甙	0.012	48.88 $\pm$ 2.89 <sup>*</sup>	27.88 $\pm$ 1.99 <sup>##</sup>	16.33 $\pm$ 1.31 <sup>##</sup>	1.70 $\pm$ 0.03 <sup>##</sup>

n=8, 与对照组比较\*P<0.05, \*\*P<0.01; 与模型组比较#P<0.05, ##P<0.01; 与对照组比较 $\Delta$  P>0.05

由表 6.3 可见, ANAE 阳性细胞各组无明显差异, 但 AA 小鼠 CD<sub>4</sub> 细胞明显增加, 而 CD<sub>8</sub> 细胞明显减少, CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 则明显升高, 风湿平治疗可使 CD<sub>4</sub>、CD<sub>8</sub>、CD<sub>4</sub>/CD<sub>8</sub> 异常恢复至正常水平。

### 实验例 7 对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响

NIH 小鼠 50 只, 体重 18~22g, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 分别灌服同体积不同剂量的药液, 每日 1 次, 连续 1 周, 末次药后 1h, 每鼠腹

腔注入 10% 鸡红细胞 0.2ml, 4h 后小鼠处死, 取出腹腔液, 用滴片法于镜下观察并计数吞噬有 CRBC 的巨噬细胞数及每巨噬细胞吞噬 CRBC 的数目, 结果见表 7。

表 7 风湿平对 ICR 小鼠腹腔巨噬 CRBC 能力和影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	吞噬百分率 (%)	吞噬指数
对照	-	10	25.75 $\pm$ 9.40	1.28 $\pm$ 0.20
风湿平	27	10	33.20 $\pm$ 12.77	1.46 $\pm$ 0.36
风湿平	40.5	10	35.20 $\pm$ 10.16	1.21 $\pm$ 0.20
风湿平	60.9	10	37.78 $\pm$ 20.14	1.53 $\pm$ 0.32
地塞米松	0.005	10	8.33 $\pm$ 10.13*	1.10 $\pm$ 0.18

\*P<0.05

由表 7 可见, 于 27、40.5 及 60.9g/kg 剂量, 风湿平对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬能力均无明显影响。

#### 实验例 8 对小鼠腹腔毛细血管通透性亢进的影响

NIH 小鼠 90 只体重 18~22g, 雌雄各半, 随机分 9 组, 分别灌服同体积不同剂量的药液 1 次或每日 1 次, 连续 3 日, 末次药后 1 小时, 每鼠腹腔注射 0.7% HAC 生理盐水溶液, 同时 iv 0.5% 依文思蓝生理盐水 0.1ml/10g, 30 分钟后小鼠脱颈椎处死, 剪开腹腔, 每鼠用 5ml 生理盐水分数次冲洗腹腔, 吸出冲洗液, 合并, 并添加生理盐水定容至 8ml / 鼠, 3000rpm 离心后取上清液于 590nm 比色测 OD 值, 结果见表 8。

表 8 风湿平对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性亢进的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	给药 次数	鼠数 (只)	染料透出量 (OD)	P 值
对照	-	-	10	0.29 $\pm$ 0.13	
风湿平	27	qd $\times$ 1	10	0.26 $\pm$ 0.14	>0.05
风湿平	40	qd $\times$ 1	10	0.25 $\pm$ 0.10	>0.05
风湿平	60	qd $\times$ 1	10	0.25 $\pm$ 0.09	>0.05
对照	-	-	10	0.28 $\pm$ 0.15	
风湿平	27	qd $\times$ 3	10	0.25 $\pm$ 0.12	>0.05
风湿平	40	qd $\times$ 3	10	0.18 $\pm$ 0.10	<0.05
风湿平	60	qd $\times$ 3	10	0.15 $\pm$ 0.13	<0.05
地塞米松	0.15	qd $\times$ 3	10	0.11 $\pm$ 0.07	<0.01

由表 8 结果可见, 风湿平对醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性亢进, 给药 1 次时无明显作用, 连续给药 3 天则有显著的抑制效果。

#### 实验例 9 对鹿角菜胶所致小鼠胸膜炎渗出和炎性细胞聚集的影响

小鼠随机分组后, 分别于尾静脉按 0.1ml/10g 体重注入 0.5% 伊文思兰生理盐水溶液, 小鼠以乙醚浅麻, 并按 0.03ml / 只给小鼠右胸腔内用特制针头注入 1% 鹿角菜胶液。分别于致炎后 4h 和 32h 断头处死小鼠, 剪开腹部, 暴露膈肌, 以 1ml 注射器分两次注入总量为 2ml 的胸腔洗液, 并收集洗液于试管中。取上述洗出液 20  $\mu$ l, 加于 400  $\mu$ l 白细胞稀释液中, 于镜下进行白细胞计数。余液 3000rpm 离心 10min, 取上清液于 600nm 处比色测定光密度, 以胸腔洗液原液校零, 结果见表 9。

表 9 风湿平对鹿角菜胶所致小鼠胸膜炎细胞聚集的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	白细胞数( $2 \times 10^5$ )		染料渗出(OD)	
		4h	32h	4h	32h
对照	—	46.0 $\pm$ 6.9	16.0 $\pm$ 9.6	0.156 $\pm$ 0.066	0.109 $\pm$ 0.019
风湿平	27	26.8 $\pm$ 4.5*	14.2 $\pm$ 8.0	0.121 $\pm$ 0.062	0.116 $\pm$ 0.031
风湿平	40.5	10.9 $\pm$ 4.0**	17.3 $\pm$ 4.6	0.100 $\pm$ 0.048	0.153 $\pm$ 0.032
风湿平	60	8.0 $\pm$ 5.5**	6.6 $\pm$ 4.7*	0.129 $\pm$ 0.066	0.092 $\pm$ 0.051
地塞米松	0.05	12.7 $\pm$ 10.2**	4.4 $\pm$ 4.0*	0.085 $\pm$ 0.045	0.063 $\pm$ 0.017

\*P<0.05, \*\*P<0.01

由表 9 可见, 风湿平对小鼠胸膜炎白细胞聚集有显著的抑制效果, 此作用以对早期聚集为尤强, 4h 时得到回归方程  $y=44.13-2.01x$ ,  $r=-0.9625$ , 对晚期聚集弱, 至 20g/kg 剂量方有显著效果, 对胸膜炎渗出则无明显影响。

#### 实验例 10 对大鼠 CMC 囊中白细胞聚集的影响



SD 大鼠体重 150~180g, 雌雄各半, 64 只随机分为 8 组, 分别灌服相同体积不同剂量的药液 1 次或每日 1 次, 连续 3 日。实验日向前一日预先于大鼠背部注射 20ml 空气造成的气囊中注入 1% CMC 溶液 20ml, 于 3.5h 及 7.5h 各吸取囊液 0.1ml, 置于 0.01% 亮甲酚蓝 PBS 溶液中染色, 于镜下计数 CMC 囊液中白细胞数, 结果见表 10。

表 10 风湿平对大鼠羧甲基纤维素囊白细胞数的影响(x $\pm$ s)

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	WBC 数( $\times 10^7/L$ )	
			3.5 小时	7.5 小时
对照	—	8	9.7 $\pm$ 4.2	57.7 $\pm$ 7.3
风湿平	27 $\times$ 1	8	8.5 $\pm$ 3.5	39.4 $\pm$ 6.5
风湿平	40 $\times$ 1	8	8.7 $\pm$ 7.3	35.3 $\pm$ 3.2
风湿平	60 $\times$ 1	8	6.6 $\pm$ 3.3	18.1 $\pm$ 8.6**
对照	—	8	10.97 $\pm$ 6.7	35.6 $\pm$ 11.2
风湿平	27 $\times$ 3	8	15.4 $\pm$ 9.7	38.6 $\pm$ 5.5
风湿平	40 $\times$ 3	8	4.8 $\pm$ 3.4**	18.4 $\pm$ 12.2**
风湿平	60 $\times$ 3	8	3.0 $\pm$ 2.8**	11.0 $\pm$ 9.2*
可的松	0.1 $\times$ 3	8	14.2 $\pm$ 8.0	41.7 $\pm$ 6.0
对照	—	8	10.9 $\pm$ 3.0	41.3 $\pm$ 6.9
风湿平	18 $\times$ 7	8	6.2 $\pm$ 3.0*	11.4 $\pm$ 6.4*
风湿平	27 $\times$ 7	8	3.7 $\pm$ 1.7**	6.4 $\pm$ 3.1**
风湿平	40 $\times$ 7	8	2.5 $\pm$ 1.9**	5.9 $\pm$ 3.9**
可的松	2mg $\times$ 1	8	1.5 $\pm$ 0.7**	3.0 $\pm$ 1.0**

与对照相比\*\*P<0.01

从表 10 可见, 风湿平对大鼠 CMC 囊中白细胞聚集有显著的抑制作用, 并呈明显量—效关系并随给药时间延长, 作用增强, 连续给药 7 天, 于 18g/kg 即能非常显著地抑制白细胞游走, 可的松囊内注射, 也有很强的抑制效果。

#### 实验例 11 对巴豆油所致小鼠耳肿胀的影响

NIH 小鼠 60 只, 体重 18~22g, 雄雌各半, 随机分为 6 组, 分别灌服同体积不同剂量的药液或西黄芪胶液, 每日 1 次, 连续 3 日, 末次药后 1h, 每鼠左耳用 2% 巴豆油合剂 0.02ml 均匀涂于耳廓两侧, 4h 后将小鼠拉断颈椎处死, 切取左右耳片, 按法称取致炎及对照耳片重量, 以左右耳片重量之差的 mg 数为耳肿胀程度, 结果见表 11。

表 11 风湿平对巴豆油所致小鼠耳肿胀的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	耳肿胀度 (mg)	抑制率 (%)	P 值
对照	-	10	44.38 $\pm$ 9.40		
风湿平	27	10	39.05 $\pm$ 12.33	12.00	>0.05
风湿平	40	10	36.65 $\pm$ 5.83	17.64	<0.05
风湿平	60	10	34.91 $\pm$ 9.71	21.34	<0.05
地塞米松	0.003	10	14.13 $\pm$ 5.75	68.16	<0.01

由表 11 可见, 风湿平对巴豆油所致小鼠耳肿有显著抑制作用, 且有量一效关系, 但量一效关系曲线较平缓, 13.5g/kg 有显著抑制效果。

#### 实验例 12 对醋酸所致小鼠扭体反应的影响

昆明种小鼠 60 只, 体重 18~22g, 雄雌各半, 随机分为 6 组, 分别灌服不同剂量的药液或西黄芪胶液, 药后 1h, 每鼠腹腔注射

0.7% HAC 生理盐水溶液 0.2ml, 将小鼠置于玻璃缸中观察各鼠发生扭体反应的潜伏期及 20 分钟内小鼠扭体次数, 结果见表 12。

表 12 风湿平对醋酸所致小鼠扭体次体的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g/kg)	鼠数 (只)	扭体次数	潜伏时间 (分)
对照	-	10	34.6 $\pm$ 4.1	3.13 $\pm$ 0.80
风湿平	27	10	28.2 $\pm$ 5.76	3.82 $\pm$ 0.85
风湿平	40	10	31.0 $\pm$ 8.4	3.86 $\pm$ 2.00
风湿平	60	10	20.7 $\pm$ 2.3*	3.95 $\pm$ 1.42
昆明山海棠	20	10	25.1 $\pm$ 11.9	3.60 $\pm$ 0.93
盐酸吗啡	10mg/kg	10	0.0 $\pm$ 0.0	0.00 $\pm$ 0.00

由表 12 可见, 风湿平于较大剂量可使醋酸所致小鼠扭体反应发生时间延迟, 并明显减少 20 分钟内小鼠扭体次数, 提示风湿平有一定镇痛作用。

#### 实验例 13 对 AA 大鼠血液流变学的影响

SD 大鼠体重 180  $\pm$  20g, 每只大鼠右后足跖皮内注射 Freund's 完全佐剂 0.05ml 制成佐剂性关节炎模型。阴性对照组每只大鼠右后足跖皮内

注射生理盐水 0.05ml。造模三周后将鼠分为模型组、高、中、低剂量组、阴性对照组和阳性对照组，阳性对照组给予雷公藤多甙片。灌服给药，每日 1 次，连续 5 天，末次给药后 1 小时，于大鼠腹主动脉取血 3ml，置于 1% 肝素抗凝试管中，用 NXE-1 型锥板式粘度计在 230、115、46、23、11.5 及  $5.75S^{-1}$  切变率下测定全血粘度，用 WTP-BII 型可调恒压毛细管粘度计测定血浆粘度；用红细胞压积管离心法测红细胞压积、红细胞聚积指数，红细胞刚性指数系由上述结果计算而得，结果见表 13。

表 13 对佐剂性关节炎大鼠血液流变性的影响(x $\pm$ s)

组别	对照组	模型组	风湿平 (30g/kg)	风湿平 (15g/kg)	风湿平 (7.5g/kg)	雷公藤多甙 (6mg/kg)
全血粘度 (mPa.s)						
230S <sup>-1</sup>	4.43 $\pm$ 0.09	4.92 $\pm$ 0.15**	4.56 $\pm$ 0.09##	4.49 $\pm$ 0.11##	4.54 $\pm$ 0.16##	4.66 $\pm$ 0.28#
115S <sup>-1</sup>	5.17 $\pm$ 0.25	5.81 $\pm$ 0.19**	5.33 $\pm$ 0.09##	5.32 $\pm$ 0.10##	5.16 $\pm$ 0.14##	5.60 $\pm$ 0.48#
46S <sup>-1</sup>	6.84 $\pm$ 0.11	7.20 $\pm$ 0.18**	6.56 $\pm$ 0.13##	6.59 $\pm$ 0.09##	6.67 $\pm$ 0.14##	6.70 $\pm$ 0.48#
23S <sup>-1</sup>	8.10 $\pm$ 0.15	8.23 $\pm$ 0.38	7.95 $\pm$ 0.22	7.93 $\pm$ 0.12	7.97 $\pm$ 0.14	8.02 $\pm$ 0.14
11.5S <sup>-1</sup>	9.35 $\pm$ 0.08	9.78 $\pm$ 0.10**	9.40 $\pm$ 0.08##	9.45 $\pm$ 0.10##	9.30 $\pm$ 0.133	9.31 $\pm$ 0.12##
6.5S <sup>-1</sup>	11.03 $\pm$ 0.14	12.66 $\pm$ 0.31**	11.21 $\pm$ 0.21##	11.29 $\pm$ 0.19##	11.60 $\pm$ 0.40##	11.42 $\pm$ 0.52#
血浆粘度 (mPa.s)	1.158 $\pm$ 0.032	1.248 $\pm$ 0.040**	1.161 $\pm$ 0.011##	1.154 $\pm$ 0.023##	1.156 $\pm$ 0.018##	1.158 $\pm$ 0.029#
红细胞压积(%)	46.13 $\pm$ 2.31	41.33 $\pm$ 1.12**	45.10 $\pm$ 2.39##	44.33 $\pm$ 1.52##	45.71 $\pm$ 1.04##	46.03 $\pm$ 3.59#
红细胞聚集指数	2.49 $\pm$ 0.032	2.58 $\pm$ 0.083*	2.46 $\pm$ 0.066#	2.49 $\pm$ 0.094#	2.44 $\pm$ 0.048##	2.45 $\pm$ 0.091#
红细胞刚性指数	6.155 $\pm$ 0.536	7.127 $\pm$ 0.557**	6.506 $\pm$ 0.558	6.525 $\pm$ 0.146	6.394 $\pm$ 0.200#	6.621 $\pm$ 0.883

与阴性对照组比较\*P<0.05, \*\*P<0.01; 与模型组比较#P<0.05, ##P<0.01

由表 13 可以看出，AA 大鼠血流型性发生明显变化，全血、血浆粘度增高，红细胞压积下降，红细胞聚集指数和刚性指数增加，风湿平治疗可使上述血液流变学指标明显改善。

以上实验例证实了风湿平的药理作用，风湿平许多重要药理作用均有良好的剂量-效应关系，提示临床中可以通过调节剂量以达到最佳疗效。

在中国、日本、澳大利亚进行了风湿平的临床疗效研究。单独使用风湿平胶囊，按国际有关病种诊断、治疗及疗效标准进行观察，结果表明，风湿平对 RA 的有效率为 94% 左右，显效率为 60% 左右，能较快地改善晨僵、肿

痛等症状及 RA 相关检测指标，见表 14~21。

表 14 治疗组和对照组治疗效果的比较

组别	例数	缓解 (临床治愈)	显效	有效	无效	显效率 (%)	有效率 (%)
治疗组	32	5	14	11	2	59.38	93.74
对照组	30	3	10	12	5	43.33	83.33

表 15 对 IgG、IgA、IgM 的影响 (X±S)

组别	例数	IgG		IgA		IgM	
		前	后	前	后	前	后
正常人	32	12.45 ± 1.48		2.37 ± 1.00		1.58 ± 0.59	
治疗组	32	16.92 ± 3.49	14.17 ± 1.39**	3.65 ± 1.03	2.39 ± 1.18**	1.89 ± 0.88	1.48 ± 1.01
对照组	30	17.03 ± 4.12	15.14 ± 2.21**	3.45 ± 1.86	2.32 ± 1.75**	2.03 ± 0.95	1.76 ± 1.28

与治疗前比较\*\*P&lt;0.01

表 16 对 C3、C4 的影响 (X±S)

组别	例数 (只)	C3		C4	
		前	后	前	后
正常人	32	0.62 ± 0.13		0.14 ± 0.15	
治疗组	32	1.88 ± 0.72	1.25 ± 0.66**	0.48 ± 0.12	0.26 ± 0.06*
对照组	30	2.13 ± 0.64	1.56 ± 0.62**	0.40 ± 0.16	0.25 ± 0.07**

与治疗前比较\*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

表 17 对 ESR、CRP 的影响 (X±S)

组别	例数 (只)	ESR		CRP	
		前	后	前	后
正常人	32	8.37 ± 5.26		4.12 ± 1.88	
治疗组	32	66.58 ± 9.01	30.31 ± 6.53**	13.35 ± 6.67	8.86 ± 3.34*
对照组	30	73.33 ± 9.09	35.83 ± 11.61**	14.21 ± 6.29	9.04 ± 3.15**

与治疗前比较\*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

表 18 握力治疗前后的比较 (X±S)

组别	治疗组		对照组	
	前	后	前	后
握力左 (mmHg)	39.13 ± 20.24(15) 34.61** (15)	80.47 ±	24.00 ± 17.63(21) 23.27** (21)	55.15 ±
右	35.85 ± 22.46(15) 36.32** (15)	85.32 ±	22.80 ± 12.32(21) 20.59** (21)	58.17 ±

与治疗前比较\*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

表 19 对关节肿痛、晨僵的影响 (X±S)

项目	治疗组		对照组	
	前	后	前	后
关节肿痛	5.79 ± 0.52	3.14 ± 0.83*	5.56 ± 2.15	3.92 ± 0.26*
晨僵时间 (分)	50.33 ± 6.47	20.24 ± 3.27**	48.75 ± 8.34	27.50 ± 3.78**

与治疗前比较\*P&lt;0.05, \*\*P&lt;0.01

表 20 对 RF 阴转的影响

组别	例数	RF 阴性		
		治前	治后	转阴率(%)
治疗组	32	24	11	54.2
对照组	30	18	10	44.4

在取得显著疗效的同时,风湿平还可使患者血清 SIL-2R、STNF、SIL-6R 等指标下降,见表 21。

表 21 对 SIL-2R、STNF、SIL-6R 等主要指标的影响 (X±S)

组别	例数 (只)	SIL-2R(u/ml)		STNF R1(ng/ml)		SIL-6R(ng/ml)	
		前	后	前	后	前	后
正常人	32	299 ±68 (n=32)		1.56 ±0.48 (n=24)		72.05 ±8.26 (n=22)	
风湿平	15	683 ±189 381 ±157**		2.87 ±0.66 1.75 ±0.54**		136.18 ±28.57 90.15 ±20.12**	
对照组	10	765 ±203 412 ±167**		2.63 ±0.72 2.38 ±0.39 (n=8)		148.21 ±30.31 99.02 ±26.70**	

与治疗前比较 \*\*P<0.01

经验证,本发明下述实施例均能实现上述发明效果。

#### 实施例 1:

淫羊藿 2222g 昆明山海棠 2222g

枸杞子 1111g 菟丝子 1111g

以上四味,昆明山海棠,切成碎块,分别加 13、10、10 倍水提取三次,每次 1 小时;淫羊藿,切段,分别加 15、10、10 倍水提取三次,每次 1 小时;枸杞子粉碎成粗料,用 20 倍水 80℃ 温浸 1 小时;菟丝子粉碎成粗粉,用 31 倍水 80℃ 温浸 1 小时;四味药材的水煎煮液或水浸液分别滤过,分别通过大孔吸附树脂柱,然后用 70%乙醇洗脱,当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液;当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕;每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥,最后得到提取物药粉;将四种提取物药粉加入药用淀粉至 200g,混匀,装 1000 粒胶囊。用本发明方法制得的胶囊每粒内装药物提取物 0.2g,且每粒胶囊中含淫羊藿甙  $C_{33}H_{40}O_{15}$  不得少于 2.0mg。常规用量为:口服,一日 3 次,每次 3 粒。

### 实施例 2:

昆明山海棠 2000g 淫羊藿 2000g

以上两味，昆明山海棠，切成碎块，分别加 13、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；淫羊藿，切段，分别加 15、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；药材的水煎煮液分别滤过，分别通过大孔吸附树脂柱，然后用 70%乙醇洗脱，当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液；当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕；每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥，最后得到提取物药粉；将提取物药粉加入药用淀粉，混匀，装 1000 粒胶囊。用本发明方法制得的胶囊每粒内装药物提取物 0.2g，且每粒胶囊中含淫羊藿甙  $C_{33}H_{40}O_{15}$  不得少于 2.0mg。常规用量为：口服，一日 3 次，每次 3 粒。

### 实施例 3:

昆明山海棠 2000g 淫羊藿 2000g

枸杞子 1000g

昆明山海棠，切成碎块，分别加 13、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；淫羊藿，切段，分别加 15、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；枸杞子粉碎成粗料，用 20 倍水 80℃温浸 1 小时；药材的水煎煮液或水浸液分别滤过，分别通过大孔吸附树脂柱，然后用 70%乙醇洗脱，当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液；当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕；每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥，最后得到提取物药粉；提取物药粉加入药用淀粉，混匀，装 1000 粒胶囊。用本发明方法制得的胶囊每粒内装药物提取物 0.2g，且每粒胶囊中含淫羊藿甙  $C_{33}H_{40}O_{15}$  不得少于 2.0mg。常规用量为：口服，一日 3 次，每次 3 粒。

### 实施例 4

昆明山海棠 2000g 淫羊藿 2000g

菟丝子 1000g

昆明山海棠，切成碎块，分别加 13、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；淫羊藿，切段，分别加 15、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；菟丝子粉碎成粗粉，用 31 倍水 80℃ 温浸 1 小时；四味药材的水煎煮液或水浸液分别滤过，分别通过大孔吸附树脂柱，然后用 70% 乙醇洗脱，当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液；当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕；每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥，最后得到提取物药粉；提取物药粉加入药用淀粉，混匀，装 1000 粒胶囊。用本发明方法制得的胶囊每粒内装药物提取物 0.2g，且每粒胶囊中含淫羊藿甙  $C_{33}H_{40}O_{15}$  不得少于 2.0mg。常规用量为：口服，一日 3 次，每次 3 粒。

#### 实施例 5

昆明山海棠 2000g      菟丝子 1000g

昆明山海棠，切成碎块，分别加 13、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；菟丝子粉碎成粗粉，用 31 倍水 80℃ 温浸 1 小时；四味药材的水煎煮液或水浸液分别滤过，分别通过大孔吸附树脂柱，然后用 70% 乙醇洗脱，当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液；当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕；每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥，最后得到提取物药粉；提取物药粉加入药用淀粉，混匀，装 1000 粒胶囊。用本发明方法制得的胶囊日服用量相当生药量 30g/日。

#### 实施例 6:

昆明山海棠 2000g      枸杞子 1000g

昆明山海棠，切成碎块，分别加 13、10、10 倍水提取三次，每次 1 小时；枸杞子粉碎成粗料，用 20 倍水 80℃ 温浸 1 小时；药材的水煎煮液或水浸液分别滤过，分别通过大孔吸附树脂柱，然后用 70% 乙醇洗脱，当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液；当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕；每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥，最后得到提取物

药粉；提取物药粉加入药用淀粉，混匀，装 1000 粒胶囊。用本发明方法制得的胶囊日服用量相当生药量 30g/日。



## 权 利 要 求

1. 一种抗风湿药物，其特征在于该药物由下述原料药制成：

昆明山海棠 淫羊藿 枸杞子 菟丝子

其中原料药可以是由昆明山海棠与其余三种药物中的任何一种或两种或三种共同组成。

2. 如权利要求 1 所述的药物，其特征在于该药物由下述份量的原料药制成：

昆明山海棠 1~4 重量份 淫羊藿 1~4 重量份

枸杞子 1~4 重量份 菟丝子 1~4 重量份

3. 如权利要求 1 所述的药物，其特征在于该药物由下述份量的原料药制成：

昆明山海棠 2 重量份 淫羊藿 2 重量份

枸杞子 1 重量份 菟丝子 1 重量份

4. 如权利要求 1 所述的药物，其特征在于还可以由上述原料药当中的有效成分制备而成，其中淫羊藿可以由淫羊藿甙，淫羊藿次甙 I，淫羊藿次甙 II 和淫羊藿糖甙 A 中的一种或一种以上代替，昆明山海棠可以由昆明山海棠当中的双萜类，三萜类和生物碱类化合物代替，菟丝子和枸杞子可以由其中所含的黄酮代替。

5. 如权利要求 1、2 或 3 所述的药物的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：

称取原料药，淫羊藿、昆明山海棠分别切碎；枸杞子、菟丝子原形或粉碎，以上四味，分别或合并用 0~95% 的乙醇于 10~98℃ 提取，连续 1~4 次，提取液分别或合并回收乙醇后浓缩，干燥，粉碎，混匀或按比例混匀，制成临床可接受的剂型；

或者称取原料药：淫羊藿、昆明山海棠切碎，分别加水煎煮三次，枸

杞子或菟丝子分别用 80℃ ~ 95℃ 水温浸 1 ~ 3 次, 每味中药的三次煎煮液或温浸液分别合并后, 各合并液分别上各自对应的大孔吸附树脂柱。吸附完毕, 用水冲洗树脂柱至流出液澄清, 然后用 30 ~ 99.5% 乙醇洗脱, 至流出液颜色变深时开始收集洗脱液, 直至洗脱液颜色由深变为很浅时, 用水压出柱上乙醇液, 并与洗脱液合并, 总洗脱液用量约为药材重量的 1 ~ 8 倍; 每味中药的洗脱液分别回收、浓缩至比重 1.10, 分别或合并喷雾干燥得各药材提取物。将各药材提取物按比例混匀, 制成临床可接受的剂型。

6. 如权利要求 1、2 或 3 所述药物的制备方法, 其特征在于用该方法可制成包括硬胶囊、软胶囊、片剂、颗粒剂、针剂在内的任何临床可接受的剂型。

7. 如权利要求 1、2 或 3 所述药物的制备方法, 其特征在于该方法包括下列步骤:

昆明山海棠, 切成碎块, 分别加 13、10、10 倍水提取三次, 每次 1 小时; 淫羊藿, 切段, 分别加 15、10、10 倍水提取三次, 每次 1 小时; 枸杞子粉碎成粗料, 用 20 倍水 80℃ ~ 95℃ 温浸 1 小时; 菟丝子粉碎成粗粉, 用 31 倍水 90℃ 温浸 1 小时; 四味药材的水煎煮液或水浸液分别滤过, 分别通过 WLD 或 D<sub>101</sub> 或其它型号大孔吸附树脂柱, 然后用 70% 乙醇洗脱, 当流出液颜色明显变深时开始收集洗脱液。当洗脱液颜色变得极浅时洗脱完毕; 每味药材的洗脱液分别回收乙醇、浓缩、干燥, 最后得到提取物药粉; 将提取物药粉按比例混匀, 制成临床可接受的剂型。

8. 如权利要求 1、2 或 3 所述药物在制备抗风湿性关节炎和类风湿性关节炎的药物中的应用。

9. 如权利要求 1、2 或 3 所述药物在制备治疗系统性红斑狼疮的药物中的应用。

10. 如权利要求 1、2 或 3 所述药物在制备治疗慢性肾炎、克隆氏病、麻风反应等自身免疫病的药物中的应用。

## 摘 要

本发明公开了一种抗风湿药物及其制备方法，该药物以昆明山海棠、淫羊藿、枸杞子、菟丝子为原料制成，本发明药物具有疗效突出、毒副反应轻和服用方便的特点。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/CN 02/00246

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7): A61K35/78, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(7): A61K35/78

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Chinese patent applications published by SIPO of China since 1985 and Chinese non-patent literatures published in China

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI(Derwent), CNPAT(CN), JOPAL, CAPS(US),PCB(CN),MIMOSA(JP),ESPACC/ACCESS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN,A, 1178697, 15.Apr.1998(15.04.98), XU, Ruimin, full text	1-8
A	CN, A, 1142970, 19.Feb.1997(19..02.97),Inner- Mongolia ALASAN CHONGRONG Co. LTD, full text	1-8
A	ZHNAG, Cun, "A Treatment of Rheumatic Arthritis with Tripterygium Hypoglaucom", published in HUNAN Magazine of Traditional Chinese Medicine, 1988,4(4), p 15-16.	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

### \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
25.Dce.2002 (25. 12. 02)

Date of mailing of the international search report  
**02 JAN 2003 (02.01.03)**

Name and mailing address of  
the State Intellectual Property Office of China (ISA/CN)  
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District,  
100088 Beijing, China

Authorized officer

ZHANG, Weibo

Telephone No. 86-10-62093734

# 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN 02/00246

## A. 主题的分类

IPC(7): A61K35/78, A61P29/00

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类体系和分类号)

IPC(7): A61K35/78

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

从 1985 年以来的中国专利局公布的专利申请和公告的专利以及中国出版的非专利文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称和, 如果实际可行的, 使用的检索词)

WPI(Derwent), CNPAT(CN), JOPAL, CAPS(US), PCB(CN), MIMOSA(JP), ESPACC/ACCESS

## C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求编号
A	CN, A, 1178697, 15.4 月 1998 (15.04.98), 徐瑞新, 全文	1-8
A	CN, A, 1142970, 19.2 月 1997(19.02.97), 内蒙古阿拉善苁蓉集团有限 责任总公司, 全文	1-8
A	张存, “昆明山海棠治疗风湿性关节炎”, 《湖南中医杂志》1988,4(4) 第 15-16 页, 摘要	1-8

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☐ 见同族专利附件。

\* 引用文件的专用类型:

“A”明确叙述了被认为不是特别相关的一般现有技术的文件

“E”在国际申请日的当天或之后公布的在先的申请或专利

“L”可能引起对优先权要求的怀疑的文件, 为确定另一篇  
引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引  
用的文件

“O”涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P”公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T”在申请日或优先权日之后公布的在后文件, 它与申请不相  
抵触, 但是引用它是为了理解构成发明基础的理论或原理

“X”特别相关的文件, 仅仅考虑该文件, 权利要求所记载的  
发明就不能认为是新颖的或不能认为是有创造性

“Y”特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件  
结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时,  
权利要求记载的发明不具有创造性

“&”同族专利成员的文件

国际检索实际完成的日期

25.12 月 2002 (25.12.02)

国际检索报告邮寄日期

02. 1月 2003 (02.01.03)

国际检索单位名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)  
中国北京市海淀区西土城路 6 号(100088)

传真号: 86-10-62019451

受权官员

张伟波

电话号码: 86-10-62093734

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**